

KATETER ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLAR TARAFINDAN ÜRETİLEN BİYOFİLMLERE KARŞI ANTİBİYOTİK ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ*

Yağmur EKENOĞLU MERDAN¹, Filiz KİBAR², Akgün YAMAN²

Y. Ekenoğlu Merdan: 0000-0002-9551-1473, F. Kibar: 0000-0003-2983-2399, A. Yaman: 0000-0003-3309-3074

¹Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA

Telif Hakkı: Bu makale CC BY-NC-ND lisansı (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) ile dağıtılan açık erişimli bir makedir ve telif hakkı © yazarlara aittir.



Öz

Stafilokoklar, kateterle ilişkili enfeksiyonların en yaygın etkenlerindendir ve biyofilm oluşturma yetenekleri bu enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran önemli bir virülans faktörüdür. Bu çalışmada, kan kateteri örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ile biyofilm oluşturma kapasiteleri *in vitro* olarak değerlendirildi. Toplam 65 izolatın antibiyotik duyarlılığı VITEK-2 otomatik sistemi ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. İzolatların oluşturduğu biyofilm kütle miktarı kristal viyole boyama yöntemiyle değerlendirildi ve elde edilen optik dansite (OD) değerlerine göre sınıflandırıldı. İzolatların %54.8'inin biyofilm pozitif (BP) olduğu tespit edildi. BP suşlar, biyofilm negatif (BN) suşlara göre çoğu antibiyotiğe daha dirençli bulundu, bu fark siprofloksasin ve tetrasiklin için istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). BP suşlarda oksasilin, vankomisin ve daptomisine karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) değerleri karşılaştırıldı, MBEK değerlerinin MİK değerlerine göre yüksek olduğu görüldü. Ayrıca, biyofilm kütlesi arttıkça MBEK50 değerlerinin de arttığı gözlemlendi. Özellikle zayıf ve orta dereceli biyofilmlerde daptomisinin eradikasyon potansiyelinin daha yüksek olduğu belirlendi. Bu bulgular, BP stafilokokların etken olduğu enfeksiyonlarda sadece MİK değerlerine dayalı tedavi stratejilerinin yetersiz kalabileceğini ve tedavinin daha etkili olarak yönlendirilebilmesi için MBEK analizlerinin dikkate alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik direnci, biyofilm, kateter ilişkili enfeksiyonlar, *Staphylococcus*

ABSTRACT

***In Vitro* Evaluation of Antibiotic Efficacy Against Biofilms Formed by Staphylococci Isolated from Catheter Samples**

Staphylococci are among the most common causes of catheter-related infections, with their ability to form biofilms posing a significant challenge to effective treatment. In this study, the antibiotic resistance profiles and biofilm formation capacities of Staphylococcus strains isolated from blood catheter samples were evaluated in vitro. Antibiotic susceptibility of a total of 65 isolates was determined using the VITEK-2 automated system and broth microdilution method. The mass of biofilm formed by the isolates was evaluated using the crystal violet staining method and classified according to the optical density (OD) values

İletişim adresi: Yağmur Ekenoğlu Merdan, Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
e-posta: ymerdan@biruni.edu.tr

Received/Geliş: 14.07.2025 Accepted/Kabul: 12.09.2025 Published Online/Online Yayın: 31.12.2025

*Çalışmanın bazı bölümleri daha önce 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (Antalya, 2017) (SS-36) ve TMC 2020 Çevrim İçi Mikrobiyoloji Sempozyumu'nda (SS 050) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Atıf/Cite as: Ekenoğlu Merdan Y, Kibar F, Yaman A. Kateter örneklerinden izole edilen stafilokoklar tarafından üretilen biyofilmlere karşı antibiyotik etkinliğinin *in vitro* değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2025;39(3):94-104.

obtained. It was found that 54.8% of the isolates were biofilm-positive (BP). BP strains were more resistant to most antibiotics compared to biofilm-negative (BN) strains, this difference was statistically significant for ciprofloxacin and tetracycline ($p<0.05$). In BP strains, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) values against oxacillin, vancomycin, and daptomycin were compared, and MBEC values were higher than MIC values. Moreover, MBEC50 values were observed to increase as biofilm mass increased. Daptomycin demonstrated superior biofilm eradication potential, especially in weak and moderate biofilms. These findings suggest that treatment strategies based solely on MIC values may be insufficient in infections caused by BP staphylococci and that MBEC analysis should be considered to guide more effective antimicrobial therapy.

Keywords: Antibiotic resistance, biofilm, catheter-related infections, *Staphylococcus*

GİRİŞ

Hasta yararı için kullanılan intravenöz kateterlerin kullanımı gün geçtikçe artmakta ve bu durum, hastane kaynaklı bakteremilerin en sık nedenini oluşturmaktadır. Kateter enfeksiyonları, hastane masraflarını, hastanede kalış süresini, morbiditeyi ve mortaliteyi artırmaktadır^(7,28). Stafilokoklar, kateter enfeksiyonlarının en yaygın etkeni olarak bilinmektedir⁽¹⁹⁾. Stafilokokların biyofilm oluşturma potansiyeli, kateter yüzeyine kolonizasyonu sağlamada önemli bir virülans faktörü olarak öne çıkmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir. Biyofilm oluşturarak, stafilokoklar hem konak savunma mekanizmalarından hem de antibiyotiklerden korunmaktadır. Biyofilm içindeki bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı 200 ila 500 kat daha dirençli olduğu tahmin edilmektedir. Çalışmalar, hastane enfeksiyonlarının %65'inin mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerden kaynaklandığını ve bu durumun tedavi maliyetini önemli ölçüde artırdığını bildirmektedir^(4,13,21,23).

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK), planktonik bakterilerin üremesini engellemek için gereken en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. MİK, antibiyotiklerin bakterilere karşı etkinliğini göstermek amacıyla kullanılmaktadır. Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) ise biyofilm içerisindeki bakterileri ortadan kaldıran en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. Son dönem çalışmalar, biyofilm oluşturan bakteriler üzerinde yalnızca MİK değil, aynı zamanda MBEK değerinin de belirlenmesinin tedavi sürecine katkı sağlayacağını vurgulamaktadır^(9,22,31).

Bu çalışmada, hastanemizdeki stafilokokal kateter enfeksiyonlarının epidemiyolojik özellikleri ile antimikrobiyal direnç profillerine ilişkin bilgi sunmak ve tedavi protokollerine ışık tutmak amaçlandı. Çalışmada, kateter örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının antimikrobiyal direnç profilleri ile biyofilm oluşturma özellikleri gösterildi. Biyofilm pozitif suşlarda, oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MİK ve MBEK değerleri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Suşlar ve antibiyotik duyarlılık testleri

Bu çalışmaya, kan kateteri örneklerinden izole edilen 65 *Staphylococcus* spp. dahil edildi. Tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri, VITEK-2 Compact otomatik sistemi (BioMérieux, Fransa) kullanılarak yapıldı. Oksasilin, vankomisin ve daptomisin MİK değerlerini belirlemek amacıyla CLSI M02-M07 standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulandı⁽¹⁰⁾. Kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Sonuçlar, CLSI 2017 kriterlerine göre değerlendirildi⁽¹⁰⁾. Metisilin direncini belirlemek amacıyla, oksasilin MİK değeri değerlendirildi ve *mecA* geninin varlığı gerçek zamanlı PCR yöntemi ile araştırıldı. DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation kiti (Roche Diagnostics, ABD), gerçek zamanlı PCR için LightCycler 480 II cihazı ve LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master kiti (Roche Diagnostics, ABD) kullanıldı. *mecA* geni için uygun primerler kullanıldı (F: 5' GCA ATC GCT AAA GAA CTA AG 3'; R: 5' GGG ACC AAC ATA ACC TAA TA 3')⁽¹²⁾. Pozitif kontrol olarak, *mecA* geni taşıdığı bilinen *S. aureus* ATCC 43300 suşu kullanıldı.

Biyofilm Testleri

Suşların biyofilm oluşturma yeteneği, Stepanovic ve ark.⁽³²⁾ tarafından tanımlanan mikropalak yöntemi ile yarı kantitatif olarak gösterildi. U tabanlı 96 kuyucuklu mikropalakların her bir kuyucuğuna 180 µl tryptic soy broth (TSB) aktarıldı. Daha sonra, 24 saatlik kültürlerden hazırlanan 0,5 McFarland bakteri süspansiyonlarından 20 µl her kuyucuğa eklendi. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, yapışmamış bakterileri uzaklaştırmak için kuyucuklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile nazikçe yıkandı. Plaklar ters çevrilerek havada kurutuldu ve ardından biyofilmler sabitlenmek üzere 60°C'de 60 dakika inkübe edildi. Her bir kuyucuğa %1'lik kristal viyole çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Ardından kuyucuklar PBS ile nazikçe yıkandı. Biyofilmlerin absorbe ettikleri kristal viyoleyi çözmek amacıyla kuyucuklara %95 etanol eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, optik dansite (OD) 570 nm dalga boyunda spektrofotometre (LX800, Biotech) ile ölçüldü. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 her teste eklendi. Sadece besiyeri içeren kuyucuklar ise steril kontrol olarak kullanıldı. Her suş üç kez test edildi. Negatif kontrolün ortalama OD değerinin üç standart sapması (SS) hesaplanarak eşik ("cut-off") değeri (ODc) belirlendi. Biyofilm düzeyleri şu şekilde değerlendirildi: OD ≤ ODc: negatif, ODc < OD ≤ 2 x ODc: zayıf, 2 x ODc < OD ≤ 4 x ODc: orta, 4 x ODc < OD: güçlü biyofilm oluşumu.

MBEK Değerlerinin Belirlenmesi

Suşların MBEK değerleri, Antunes ve ark.⁽³⁾ tarafından tanımlanan yöntem ile belirlendi. Yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak izolatların biyofilm oluşturmalarına izin verildi, ardından kuyucuklar steril izotonik sodium klorür çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra, oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MBEK belirlemesi amacıyla biyofilmlere uygun besiyerleri ve antibiyotikler uygulandı. Besiyeri olarak; vankomisin için katyon ayarlı Mueller–Hinton buyyon (CAMHB), oksasilin için %2 NaCl ilaveli CAMHB, daptomisin için ise 50 µl/ml kalsiyum içeren CAMHB kullanıldı. Her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda (vankomisin ve oksasilin için 256–0.12 µl/ml, daptomisin için 32–0.06 µl/ml) 100 µl antibiyotik çözeltisi eklendi. Yıkama, fiksasyon ve boyama işlemlerinin ardından biyofilm biyokütlesi oluşumu 570 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü ve OD değerlerine göre değerlendirildi. ODc değerinin altında kalan ilk konsantrasyon MBEK olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi "SPSS Statistics 20" paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik veriler, ki-kare testi ve Fisher'in exact testi ile analiz edildi; anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Bu çalışma, Helsinki Deklarasyonu (2013) ilkelerine uygun olarak yürütüldü ve Çukurova Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 3 Nisan 2015 – Karar No: 7).

BULGULAR

Bu çalışmaya 35 (%56.5) *Staphylococcus epidermidis*, 12 (%19.4) *Staphylococcus haemolyticus*, 6 (%9.7) *Staphylococcus hominis*, 5 (%8.1) *S. aureus*, 3 (%4.8) *Staphylococcus capitis* ve 1 (%1.6) *Staphylococcus warnerii* suşu dahil edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 1'de gösterildi. Otomatik sistemle linezolidde dirençli olarak saptanan dört *S. epidermidis* izolatı gradiyent şerit yöntemiyle de test edilerek linezolid MİK değeri belirlendi ve CLSI kriterlerine göre değerlendirildi. Buna göre bu dört izolattan biri duyarlı olarak değerlendirildi. Tigesikline dirençli bir MRSA izolatı tespit edildi. İzolatların 56'sı (%90.3) *mecA* pozitif bulundu. Mikrodilüsyon testi ile oksasilin direnci saptanmasına rağmen, yalnızca bir suşta (%1.6) *mecA* geni tespit edilmedi ve bu suş metisiline duyarlı kabul edildi. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) oranı %40, metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKoNS) oranı ise %94.7 olarak belirlendi. Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MİK aralıkları sırasıyla 0.125 - >128 µg/ml, 0.125–4 µg/ml ve 0.06–1 µg/ml olarak belirlendi. İzolatların MİK₅₀ / MİK₉₀ değerleri oksasilin için 32 / >128 µg/ml, vankomisin için 1 / 2 µg/ml, daptomisin için ise 0,25 / 1 µg/ml olarak belirlendi.

Tablo 1. İzole edilen *Staphylococcus* türlerinin antibiyotiklere karşı direnç oranları ve iMLSB* pozitiflik durumu [n (%)].

Antibiyotik	Gentamisin	Oksasilin	Siprofloksasin	Vankomisin	Eritromisin	Klindamisin	Linezolid	Daptomisin	Tetrasiklin	Tigesiklin	Fosfomisin	Fisidik asit	TMP-SMX	iMLSB*
<i>S. epidermidis</i> n=35	19 (54.3)	35 (100)	25 (71.4)	0 (0)	30 (85.7)	21 (60)	3 (8.6)	0 (0)	23 (65.7)	0 (0)	3 (8.6)	23 (65.7)	6 (17.1)	4 (11.4)
<i>S. haemolyticus</i> n=12	10 (83.3)	12 (100)	12 (100)	0 (0)	12 (100)	7 (58.3)	0 (0)	0 (0)	7 (58.3)	0 (0)	12 (100)	12 (100)	2 (16.7)	2 (16.7)
<i>S. hominis</i> n=6	1 (16.7)	5 (83.3)	3 (50)	0 (0)	5 (83.3)	2 (33.3)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	0 (0)	5 (83.3)	5 (83.3)	0 (0)	2 (33.3)
<i>S. aureus</i> n=5	1 (20)	2 (40)	1 (20)	0 (0)	2 (40)	2 (40)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	1 (20)	1 (20)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
Diğer n=4	3 (75)	3 (75)	3 (75)	0 (0)	4 (100)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	4 (100)	3 (75)	0 (0)	0 (0)
Toplam	34 (54.8)	57 (91.9)	44 (71)	0 (0)	53 (85.5)	35 (56.4)	3 (4.8)	0 (0)	37 (59.6)	1 (1.6)	25 (40.3)	43 (69.4)	8 (12.9)	9* (14.5)

* iMLSB: İndüklenebilir klindamisin direnci

TMP-SMX: Trimetoprim-sülfametoksazol

Dahil edilen suşlardan 34'ü (%54.8) biyofilm pozitif (BP) olarak belirlendi. BP suşların biyofilm oluşturma özellikleri değerlendirildiğinde; 8 (%23.5) suşun zayıf pozitif (+), 11 (%32.4) suşun orta düzeyde pozitif (++), 15 (%44.1) suşun ise güçlü pozitif (+++) biyofilm oluşturduğu saptandı. BP ve BN suşların antibiyotik direnç paternleri Tablo 2'de gösterildi. Yapılan istatistiksel analizde, siprofloksasin ve tetrasiklin için direnç oranlarının BP izolatlarında anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Buna karşılık, fosfomisin direncinin BN izolatlarında anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). Diğer antibiyotiklerde anlamlı bir fark izlenmedi. BP ve BN suşların oksasilin, vankomisin ve daptomisin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 2. Biyofilm pozitif (BP) ve biyofilm negatif (BN) *Staphylococcus* suşlarının antibiyotik direnç oranları ve iMLSB* pozitiflik durumu [n (%)].

Antibiyotik	Gentamisin	Oksasilin	Siprofloksasin	Vankomisin	Eritromisin	Klindamisin	Lineolid	Daptomisin	Tetrasiklin	Tigesiklin	Fosfomisin	Fisidik asit	TMP-SMX	iMLSB*
Biyofilm pozitif (n=34)	21 (61.8)	33 (97.1)	28 (82.4)	0 (0)	29 (85.3)	22 (64.7)	3 (8.8)	0 (0)	28 (82.4)	1 (2.9)	9 (26.5)	23 (67.6)	6 (17.6)	3* (8.8)
Biyofilm negatif (n=28)	13 (46.4)	24 (85.7)	15 (53.6)	0 (0)	23 (82.1)	13 (46.4)	0 (0)	0 (0)	9 (32.1)	0 (0)	15 (53.6)	19 (67.9)	2 (7.1)	6* (21.4)

* iMLSB: İndüklenebilir klindamisin direnci

Tablo 3. Biyofilm pozitif (BP)* ve biyofilm negatif (BN) *Staphylococcus* suşlarının biyofilm düzeylerine göre oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (µg/ml).

Biyofilm Pozitifliği	Oksasilin	Vankomisin	Daptomisin
Zayıf (+)	MİK ₅₀	32	1
(n=8)	MİK ₉₀	>128	2
Orta (++)	MİK ₅₀	4	1
(n=11)	MİK ₉₀	>128	1
Güçlü (+++)	MİK ₅₀	>128	1
(n=15)	MİK ₉₀	>128	2
Negatif	MİK ₅₀	32	0.5
(n=28)	MİK ₉₀	>128	2
Tümü	MİK ₅₀	32	0.25
	MİK ₉₀	>128	2

*BP suşlar biyofilm üretim düzeyine göre zayıf (+), orta (++), güçlü (+++) olarak sınıflandırılmıştır.

Mikroplak yöntemi ile BP olduğu saptanan 34 izolatın biyofilmleri üzerine oksasilin, vankomisin ve daptomisin etkileri değerlendirildi. Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MBEK aralığı sırasıyla 0.25 – >128. 0.125 – >128 ve 0.5 – >32 µg/ml olarak belirlendi. Suşların MBEK₅₀ / MBEK₉₀ değerleri; oksasilin için 64 />128, vankomisin için 128 />128, daptomisin için ise 4 />32 µg/ml bulundu. İzolatların planktonik formları ile biyofilm oluşturan formları arasındaki antibiyotik duyarlılık farkını karşılaştırmak amacıyla, MİK_{50/90} ve MBEK_{50/90} değerleri Tablo 4'te gösterildi. Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MBEK₅₀ ve MBEK₉₀ değerleri, suşların biyofilm özelliklerine göre Tablo 5'te sunuldu.

Tablo 4. Biyofilm pozitif (BP) suşların MİK₅₀, MİK₉₀, MBEK₅₀ ve MBEK₉₀ değerleri (µg/ml).

	Oksasilin	Vankomisin	Daptomisin
MİK ₅₀	32	1	0.5
MİK ₉₀	>128	2	1
MBEK ₅₀	64	128	4
MBEK ₉₀	>128	>128	>32

Tablo 5. *Staphylococcus* suşlarının biyofilm oluşturma düzeylerine göre MBEK₅₀ ve MBEK₉₀ değerleri (µg/ml).

Biyofilm		Oksasilin	Vankomisin	Daptomisin
Zayıf (+)	MBEK ₅₀	64	32	1
	MBEK ₉₀	>128	>128	8
Orta (++)	MBEK ₅₀	64	64	1
	MBEK ₉₀	>128	>128	8
Güçlü (+++)	MBEK ₅₀	128	128	16
	MBEK ₉₀	>128	>128	>32

*BP suşlar biyofilm üretim düzeyine göre zayıf (+), orta (++) , güçlü (+++) olarak sınıflandırılmıştır.

mecA genini taşıyan 56 izolatın 32'si (%57.1), *mecA* genini taşımayan altı izolatın ikisi (%33.3) BP olarak saptandı. Toplam 34 BP suşun 32'sinde (%94.1) *mecA* geni pozitif iken, 28 BN suşun 24'ünde (%85.7) pozitif. Biyofilm pozitifliği ile *mecA* geni varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0.05).

TARTIŞMA

Stafilokoklar, kateter ilişkili enfeksiyonlarda en sık rastlanan patojenlerdir. Kateter yüzeylerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri, bakteriyel kolonizasyonu kolaylaştırması ve etkili tedaviyi önemli ölçüde engellemesi nedeniyle önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm oluşumu, stafilokokların kalıcı enfeksiyonlar geliştirmesine, konak bağışıklık savunmasından ve antibiyotiklerden kaçmasına olanak tanımaktadır^(30,37,38).

Çalışmamızda, kateter örneklerinden elde edilen *Staphylococcus* suşlarının dağılımı, antimikrobiyal direnç profilleri ve biyofilm oluşturma potansiyelleri ortaya konuldu. Bu çalışmada, *S. epidermidis*'in %56.5 oranıyla baskın tür olduğu, diğer türlerin ise daha düşük oranlarda bulunduğu gözlemlendi. Bu dağılım, KNS kateter ilişkili enfeksiyonlardaki rolünü vurgulayan önceki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir^(18,20,27,36).

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları incelendiğinde, oksasilin için belirlenen yüksek MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri, bu izolatların beta-laktam antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde dirençli olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, suşların %90.3'ünde *mecA* geninin pozitif bulunmasıyla desteklenen *mecA*-aracılı direnç mekanizmasıyla uyumludur. Hastane enfeksiyonlarıyla ilişkili KoNS izolatlarının yaklaşık %80–90'ı metisilin dirençlidir⁽²⁵⁾. Çalışmamızda MRSA oranı %40 olarak belirlenirken, bölgesel bir araştırmada bu oran %44.3 olarak bildirilmiştir⁽¹⁶⁾. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda ise MRSA oranının bölgemize kıyasla daha düşük (%26.2–31.3) olduğu bildirilmiştir^(5,17).

Bölgemizde metisilin direncinin diğer bölgelere göre daha yüksek düzeyde olması, her bölgenin hatta her merkezin direnç oranlarının farklılık gösterebilmesiyle açıklanabilir. Otomatik sistemle linezolid dirençli bulunan dört *S. epidermidis* izolatından birinde E-test ile duyarlı olduğunun doğrulanması, laboratuvar tanı sonuçlarının teyidinin önemini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda elde edilen linezolid ve tigesiklin direnç profilleri, ülkemizde yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, ülkemizdeki çalışmalarda olduğu gibi, çalışmamıza dahil edilen izolatların hiçbirinde vankomisin veya daptomisin direncine rastlanmadı^(5,16,17,25).

S. aureus ve *S. epidermidis*, kateterler üzerinde sıklıkla biyofilm oluşturarak enfeksiyon riskini artırmaktadır; kristal viyole boyama yöntemi, bu izolatlarda yüksek biyofilm prevalansını sıklıkla ortaya koymaktadır^(26,30,37). Bu çalışmaya dahil edilen 62 suşun 34'ü (%54.8) biyofilm oluşturma yeteneği gösterdi. BP izolatlar %23.5 zayıf, %32.4 orta düzeyde ve %44.1 güçlü biyofilm oluşturan olarak sınıflandırıldı. KNS suşlarının %56.1'inin ve *S. aureus* suşlarının %40'ünün biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Öcal ve ark.'nın 2017 tarihli çalışmasında⁽³⁸⁾, kateter örneklerinden izole edilen 35 KNS suşunun 29'u (%82.6) BP bulunmuş; bu suşların 8'i (%27.6) zayıf (+), 12'si (%41.4) orta düzeyde (++), 9'u (%31) ise güçlü (+++) biyofilm oluşturunca olarak sınıflandırılmıştır. Antunes ve ark.⁽¹⁾ ise venöz kateterlerden izole edilen 224 *Staphylococcus* suşunun (185 KNS ve 39 *S. aureus*) tamamının biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Öcal ve ark.'nın⁽³⁷⁾ 2022 yılında yalnızca KNS izolatlarını incelediği çalışmasında ise BP oranı %68.1 olarak belirlenmiş; bu oran zayıf (%32.4), orta (%45.7) ve güçlü (%21.9) üreticiler olarak sınıflandırılmıştır. Aynı metodolojiyi kullanan ve benzer örnekleme kriterlerine sahip bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmamızda biyofilm pozitiflik oranı daha düşük bulunmuştur. Bu durum, her hastanenin kendine özgü izolat profiline sahip olabileceğini ve biyofilm oluşum eğilimlerinin izlenebilmesi için periyodik sürveyans çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, BP suşların gentamisin, oksasilin, siprofloksasin, eritromisin, klindamisin, linezolid, minosiklin, tigesiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol dahil olmak üzere test edilen birçok antibiyotige karşı BN suşlara kıyasla daha yüksek direnç gösterdiği saptandı. Ancak, bu farkların çoğu antibiyotik için istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte, BP izolatlarda siprofloksasin ve tetrasiklin direnci anlamlı düzeyde daha yüksek bulunurken ($p < 0.05$), fosfomisin direnci BN izolatlarda anlamlı olarak daha yaygın izlendi. Çalışmamıza benzer şekilde, hem ulusal hem de uluslararası çalışmalarda, bildirilen oranlardaki değişkenliğe rağmen genel olarak BP suşlarda daha yüksek direnç gözlemlenmiştir. Bu bulgular, biyofilm oluşumunun antimikrobiyal direnç gelişimine katkıda bulunan önemli bir etken olduğunu desteklemektedir^(29,34,35).

Oksasilin, vankomisin ve daptomisin için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerlerinin biyofilm oluşturma kategorilerine göre analizi, BP stafilokoklarda antibiyotik duyarlılığında biyofilm kütlelerine ters orantılı olarak azalma eğilimini ortaya koymaktadır. BP suşlarda oksasilin direnci belirgin şekilde artış göstermiş; Oksasilin için $MİK_{50}$ değeri, güçlü biyofilm oluşturan suşlarda BN izolatlara kıyasla 4 kattan fazla artış göstermiştir. Vankomisin açısından, BP suşlarda $MİK_{50}$ değeri yaklaşık iki kat yükselmiş; $MİK_{90}$ değerinde ise gruplar arasında fark izlenmemiştir. Daptomisin için ise $MİK_{50}$ değeri, orta ve güçlü biyofilm oluşturan suşlarda yaklaşık iki kat artış göstermiştir. BP suşlarda gözlemlenen artmış $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri, biyofilm oluşumu ile artan antimikrobiyal direnç arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Bu bulgular, biyofilm ilişkili stafilokokal enfeksiyonlara karşı daha etkili veya alternatif tedavi stratejilerine duyulan gereksinimi vurgulamaktadır.

Biyofilm oluşturan stafilokokların antibiyotik direncini anlamada MBEK kavramı büyük önem taşımaktadır. MBEK, bir biyofilmi ortadan kaldırmak için gereken en düşük antibiyotik konsantrasyonunu ifade eder ve planktonik bakteriler için kullanılan $MİK$ değerinden anlamlı düzeyde daha yüksektir⁽²⁾. Çalışmamızda, öncelikle planktonik hücrelerin oksasilin, vankomisin ve daptomisine duyarlılığı araştırılarak $MİK$ değerleri belirlendi. Ardından, bu üç antibiyotiğin farklı konsantrasyonları BP suşlar tarafından oluşturulan biyofilmlere uygulandı ve biyofilmler üzerindeki etkinlikleri MBEK değerleri belirlenerek değerlendirildi. $MİK$ ve MBEK değerlerinin karşılaştırmalı analizi, biyofilm içerisinde yer alan stafilokokların, planktonik hücrelere kıyasla eradikasyon için belirgin şekilde daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (Tablo 4). Oksasilin için $MBEK_{50}$ değeri, $MİK_{50}$ değerine kıyasla yaklaşık 2 kat artış göstermiştir. Vankomisin için $MBEK_{50}$ ve $MBEK_{90}$ değerleri, sırasıyla $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerlerine göre 128 kat ve 64 kattan fazla artmıştır. Daptomisin açısından ise $MBEK_{50}$ değeri $MİK_{50}$ 'ye göre 8

kat, MBK₅₀ değeri ise MİK₉₀'ye göre 32 kattan fazla artış göstermiştir. Bu bulgular, biyofilm oluşumunun antibiyotik etkinliğini anlamlı düzeyde azalttığını ortaya koymakta ve özellikle BP izolat oranlarının yüksek olduğu hastanelerde, yalnızca MİK değerlerinin esas alınmasının tedavi seçiminde yetersiz kalabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, biyofilm kaynaklı enfeksiyonların etkin şekilde yönetilebilmesi için MBK testlerinin de değerlendirme sürecine entegre edilmesi, en uygun antibiyotik ve dozun belirlenmesi açısından kritik öneme sahip olduğunu düşündürmektedir.

MBK₅₀/MBK₉₀ değerlerinin, biyofilm kütlesi arttıkça yükseldiği gözlemlendi. Oksasiline için zayıf ve orta derecede biyofilm oluşturan suşlarda MBK₅₀ ve MBK₉₀ aynı olsa da, güçlü biyofilm oluşturan suşlarda MBK₅₀ değerinin iki katına çıkarak 128 µg/ml'ye ulaştığı görüldü. Vankomisin için MBK₅₀ değerinin biyofilm kütlesine paralel olarak iki kat arttığı, MBK₉₀ değerinin ise tüm biyofilm düzeylerinde değişmeden oldukça yüksek bir düzeyde seyrettiği gözlemlendi. Daptomisin için zayıf ve orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatlarda MBK₅₀ ve MBK₉₀ değerleri aynı kalırken, güçlü biyofilm oluşturan suşlarda bu değerlerin sırasıyla 16 kat ve 4 kat arttığı belirlendi. Öcal ve ark.'nın 2022 yılında yaptıkları çalışmada⁽³⁷⁾, vankomisin MBK/MİK oranlarının belirgin şekilde yüksek olduğu ve biyofilm oluşturma kapasitesine paralel olarak arttığı bildirilmiştir. Aynı grubun 2017'de yayımladığı çalışmada da⁽³⁸⁾, vankomisin daptomisine kıyasla daha yüksek MBK ve MBK/MİK oranlarına sahip olduğu, özellikle güçlü biyofilm oluşturan suşlarda MBK₅₀/MİK₅₀ ve MBK₉₀/MİK₉₀ oranlarının en yüksek düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızda da MBK değerlerinin biyofilm kütlesiyle paralel olarak arttığı gösterildi. Bu durum, biyofilm oluşumunun antibiyotik direncini artırdığını ortaya koymakta ve özellikle güçlü biyofilm oluşturan suşlara karşı yeni anti-biyofilm ajanların veya tedavi stratejilerinin geliştirilmesine duyulan acil gereksinimi göstermektedir.

Bulgularımıza göre, daptomisin BP stafilokoklara karşı vankomisin ve oksasiline kıyasla daha yüksek etkinlik göstermiş, bu özelliğiyle özellikle umut vaat eden bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmıştır. Yüksek daptomisin konsantrasyonları (>4 µg/ml), klinik uygulamalarda hem planktonik hem de biyofilm içerisindeki stafilokokları eradike etmek için uygun hedef konsantrasyon olarak değerlendirilebilir. Önceki çalışmalar, daptomisin biyofilm biyokütlesini ve canlı hücre sayısını anlamlı düzeyde azalttığını, ayrıca vankomisine kıyasla üstün etkinlik sergilediğini bildirmiştir^(6,33). Bunun yanı sıra, biyofilm yapıları içerisine etkin şekilde penetre olabildiği gösterilmiştir^(6,8,33). Çalışmamıza benzer çalışmalarda, daptomisin biyofilm oluşturan *Staphylococcus* suşlarına karşı etkinlik gösterdiği, MİK değerlerinin üzerindeki konsantrasyonlarda hem bakteri canlılığını hem de biyofilm biyokütlesini anlamlı düzeyde azalttığı ortaya konmuştur^(6,11). Buna karşılık, vankomisin bu bağlamda sınırlı etkinlik gösterdiği, oldukça yüksek MBK değerleri ile bildirilmiştir; bu durum, biyofilmler içerisine antibiyotik zayıf penetrasyonu ve azalmış etkinliğine işaret etmektedir⁽²⁴⁾. Oksasilin, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşlarına karşı etkili olmakla birlikte, metisiline dirençli suşlara karşı sınırlı etkinlik göstermektedir⁽⁶⁾. Bu bulgular, biyofilmle ilişkili direnç mekanizmalarının antibiyotik etkinliğini büyük ölçüde azalttığı yönündeki genel görüşü desteklemektedir. Bu durum, sağlık hizmetlerinde kullanılan invaziv araçlara bağlı stafilokokal enfeksiyonların tedavi seçenekleri değerlendirilirken MİK değerlerine ek olarak MBK değerlerinin de dikkate alınmasının önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda BP suşların büyük çoğunluğu (%94.1) *mecA* genini taşımakta olsa da, biyofilm oluşumu ile *mecA* gen pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0.05$). Bu durum, metisilin direnci ve biyofilm oluşumunun *Staphylococcus* izolatlarında sık görülmekle birlikte doğrudan ilişkili değil, birbirinden bağımsız virülans faktörleri olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. Bulgularımızla uyumlu olarak, bazı çalışmalar da *mecA* gen varlığı ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki bildirmemiş ve bu iki virülans faktörünün bağımsız olarak etkili olabileceği görüşünü desteklemiştir^(14,15). Buna karşılık, Aghmiyuni ve ark.⁽¹⁾ tarafından 2024 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarında *mecA* gen varlığı ile güçlü biyofilm üretimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Bu farklı sonuçlar, *mecA* ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin suş tipine ve enfeksiyon bölgesine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Bu durum, söz konusu ilişkinin daha net anlaşılabilmesi için kapsamlı ve çok yönlü çalışmalara duyulan gereksinimi ortaya koymaktadır.

Bilgimiz dâhilinde, bu çalışma kateter ilişkili enfeksiyonlara neden olan stafilokokların biyofilm oluşturma potansiyelini bölgemizde değerlendiren ilk ve tek çalışmadır ve yerel düzeyde değerli veriler sunmaktadır. Bununla birlikte, çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Sınırlı örneklem büyüklüğü, tek merkezli tasarımı, yalnızca üç antibiyotik için MBEK değerlerinin değerlendirilmiş olması ve in vivo doğrulamanın yapılmamış olması, elde edilen bulguların genellenebilirliğini kısıtlayabilir.

Bulgularımız, hastanemizde ve bölgemizde daha önce benzer bir çalışma yapılmamış olması nedeniyle, kateter ilişkili enfeksiyonlardaki *Staphylococcus* suşlarının biyofilm oluşturma potansiyeline ışık tutmaktadır. BP izolatlarında oksasilin, vankomisin ve daptomisin için MBEK değerlerinin belirlenmesi, biyofilm ilişkili stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde uygun antibiyotiklerin ve doz stratejilerinin belirlenmesine katkı sağlamaktadır. Sonuçlarımız, vankomisin ve oksasilin biyofilmlere karşı etkisiz kaldığını, daptomisinin ise daha yüksek ancak klinik olarak ulaşılabilir dozlarda etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, BP suşların tedavisinde daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulabileceğini ve biyofilme özgü antimikrobiyal duyarlılık testlerinin klinik önemini vurgulamaktadır.

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (03.04.2015-Karar No: 7) ile gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından DKT-2016-7334 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee of Çukurova University (03.04.2015, Decision No: 7).

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Support: This study was supported by the Çukurova University Rectorate Research Fund under the project number DKT-2016-7334.

KAYNAKLAR

1. Aghmiyuni ZF, Ahmadi MH, Sadari H. Relationship between the strength of biofilm production and the presence of pvl and mecA genes in *Staphylococcus aureus* isolated from skin and soft tissue infections. *Heliyon*. 2024 Dec;10(23):e40524. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40524>
2. Antunes ALS, Bonfanti JW, Perez LRR, et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):51-5. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000100008>
3. Antunes ALS, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CCF, Perez LRR, Macedo AJ, et al. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS*. 2010;118(11):873-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02681.x>
4. Assefa M, Amare A. Biofilm-associated multi-drug resistance in hospital-acquired infections: a review. *Infect Drug Resist*. 2022;15:5061-8. <https://doi.org/10.2147/IDR.S379502>
5. Bahçeci İ. *Staphylococcus aureus* suşlarında antimikrobiyal direnç: üç yıllık çalışma (*S. aureus* bakteriyemisi ve antimikrobiyal direnç). *RMJ*. 2023;1(4):6-19.
6. Bauer J, Siala W, Tulkens PM, Van Bambeke F. A combined pharmacodynamic quantitative and qualitative model reveals the potent activity of daptomycin and delafloxacin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2726-37. <https://doi.org/10.1128/AAC.00181-13>
7. Bayındır Bilman F, Can F, Kaya M, Yazıcı AC. Investigation of biofilm-associated antibiotic susceptibilities of methicillin-resistant staphylococci isolated from catheter-related nosocomial infections. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(3):401-16. <https://doi.org/10.5578/mb.5637>

8. Boudjemaa R, Briandet R, Revest M, et al. New insight into daptomycin bioavailability and localization in *Staphylococcus aureus* biofilms by dynamic fluorescence imaging. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(8):4983-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.00735-16>
9. Chen X, Thomsen TR, Winkler H, Xu Y. Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):264. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01947-9>
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; CLSI document M100. 27th ed. Wayne, PA: CLSI; 2017.
11. Domínguez-Herrera J, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, et al. Efficacy of daptomycin versus vancomycin in an experimental model of foreign-body and systemic infection caused by biofilm producers and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):613-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.05606-11>
12. Fang H, Hedin G. Rapid screening and identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples by selective-broth and real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):2894-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.2894-2899.2003>
13. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
14. Gaire U, Thapa Shrestha U, Adhikari S, et al. Antibiotic susceptibility, biofilm production, and detection of *mecA* gene among *Staphylococcus aureus* isolates from different clinical specimens. *Diseases.* 2021;9(4):80. <https://doi.org/10.3390/diseases9040080>
15. González-Vázquez R, Córdova-Espinoza MG, Escamilla-Gutiérrez A, et al. Detection of *mecA* genes in hospital-acquired MRSA and SOSA strains associated with biofilm formation. *Pathogens.* 2024;13(3):212. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030212>
16. Gümüş HH. Prevalence and resistance trends of Gram-positive cocci *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. in a tertiary care hospital. *Cukurova Med J.* 2023;48(3):1177-86. <https://doi.org/10.17826/cumj.1350843>
17. Gündüz A, Mansur A. Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus*'un antibakteriyel direnç oranları: 8 yıllık retrospektif değerlendirme. *J Med Top Updates.* 2024;3(3):85-95. <https://doi.org/10.58651/jomtu.1581336>
18. He Y, Zhao H, Wei Y, Gan X, Ling Y, Ying Y. Retrospective analysis of microbial colonization patterns in central venous catheters, 2013-2017. *J Healthc Eng.* 2019;2019:1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/8632701>
19. Hebeisen UP, Atkinson A, Marschall J, Buetti N. Catheter-related bloodstream infections with coagulase-negative staphylococci: are antibiotics necessary if the catheter is removed? *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):21. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0474-x>
20. Jayaweera JAAS, Sivakumar D. Asymptomatic central line-associated bloodstream infections in children implanted with long-term indwelling central venous catheters in a teaching hospital, Sri Lanka. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):457. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05190-5>
21. Li P, Yin R, Cheng J, Lin J. Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11680. <https://doi.org/10.3390/ijms241411680>
22. Marquès C, Tasse J, Pracros A, et al. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J Med Microbiol.* 2015;64(9):1021-6. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000125>
23. Mishra S, Gupta A, Upadhye V, Singh SC, Sinha RP, Häder DP. Therapeutic strategies against biofilm infections. *Life.* 2023;13(1):172. <https://doi.org/10.3390/life13010172>
24. Mulla S, Kumar A, Rajdev S. Comparison of MIC with MBEC assay for in vitro antimicrobial susceptibility testing in biofilm forming clinical bacterial isolates. *Adv Microbiol.* 2016;6(2):73-8. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.62007>

25. Orhan Z, Kayış A, Küçük B, Doğaner A, Aral M. Antimicrobial resistance in staphylococci isolated from various clinical specimens of inpatients in intensive care units: a 4-year evaluation. *Turk J Intensive Care*. 2024;22(1):24-30. <https://doi.org/10.4274/tybd.galenos.2023.60352>
26. Pandian Maharaja, Pasupathy Sekar. A study of biofilm formation in indwelling catheter devices in ICU & PICU of SRM Medical College Hospital and Research Centre. *Int J Life Sci Pharma Res*. 2018;8(4):21-5. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2018.8.4.L21-25>
27. Pinto M, Borges V, Nascimento M, et al. Insights on catheter-related bloodstream infections: a prospective observational study on the catheter colonization and multidrug resistance. *J Hosp Infect*. 2022;123:43-51. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.025>
28. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. *Am J Infect Control*. 2010;38(2):95-104.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2009.12.004>
29. Sahal G, Bilkay IS. Multi-drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Braz J Microbiol*. 2014;45(2):539-44. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014005000042>
30. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>
31. Shin HJ, Yang S, Lim Y. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* with different degrees of biofilm formation. *J Anal Sci Technol*. 2021;12(1):41. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00294-2>
32. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-9. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
33. Sutrave S, Kikhney J, Schmidt J, et al. Effect of daptomycin and vancomycin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms: an in vitro assessment using fluorescence in situ hybridization. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221786>
34. Tel O, Aslantaş Ö, Keskin O, Yılmaz E, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from gangrenous mastitis of ewes. *Acta Vet Hung*. 2012;60(2):189-97. <https://doi.org/10.1556/AVet.2012.016>
35. Tuladhar RS, Shrestha R, Lekhak S, Chaudhary M, Manandhar S. Antibiotic resistance profile of biofilm producing staphylococci isolated from different clinical samples. *J Inst Sci Technol*. 2023;28(2):35-42. <https://doi.org/10.3126/jist.v28i2.52739>
36. Oliveira A, Pinheiro-Hubinger L, Pereira VC, et al. Staphylococcal biofilm on the surface of catheters: electron microscopy evaluation of the inhibition of biofilm growth by RNAIII inhibiting peptide. *Antibiotics*. 2021;10(7):879. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070879>
37. Öcal D, Tekeli A, Dolapçı İ. Investigation of biofilm formation properties of coagulase-negative staphylococci isolated from catheter-related bloodstream infections. *Mikrobiyol Bul*. 2022;56(3):506-24. <https://doi.org/10.5578/mb.20229710>
38. Öcal DN, Dolapçı İ, Karahan ZC, Tekeli A. Investigation of biofilm formation properties of *Staphylococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul*. 2017;51(1):10-9. <https://doi.org/10.5578/mb.46552>